

Über die phototoxische Wirkung
polyzyklischer Aromaten auf menschliche Zellkulturen

von

Linda Gretel Mueller

aus

New York / U.S.A.

1979

1980 # 118

Aus dem Institut für Umwelthygiene und Präventivmedizin

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Gräf

Über die phototoxische Wirkung polyzyklischer Aromaten auf menschliche Zellkulturen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

dem Fachbereich Medizin

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg



vorgelegt

von

Linda Gretel Mueller

aus

New York / U.S.A.

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr.Dr. W. Gräf

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.1979

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Bei Versuchen zur Bestimmung der physiologischen Wirkung von Akridin auf Paramecien machte Oscar R a a b im Jahre 1898 die überraschende Beobachtung, daß bei gleichzeitigem Lichteinfall selbst hochverdünnte Lösungen des Farbstoffs akut toxische Eigenschaften besaßen, während sich die gleichen Lösungen im Dunklen als zellverträglich erwiesen (1). Dieselbe Erscheinung konnte bald an weiteren Farbstoffen und Pigmenten demonstriert werden, wobei die betreffenden Substanzen in Abwesenheit von Licht meist auch in hohen Konzentrationen physiologisch inaktiv blieben (2,3).

Der Münchener Pharmakologe und Lehrer O. Raabs, Prof. H. v. T a p p e i n e r , in dessen Labor die ersten Untersuchungen der neuentdeckten Substanzeigenschaft durchgeführt wurden, prägte für diese Form einer licht-induzierter Sensibilisierung den Begriff "photodynamische Erscheinung" (4). Er wurde von späteren Autoren allgemein übernommen und dient heute zur Charakterisierung solcher photochemischer Reaktionen, bei denen ein Substrat durch eine "photodynamisch aktive" Substanz in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und bei Einwirkung elektromagnetischer Strahlung bestimmter Wellenlänge toxisch geschädigt bzw. verändert wird (5).

Mit Raab's Entdeckung begann eine Ära intensiver Forschung auf dem Gebiet lichtabhängiger Substanzwirkungen. Es stellte sich bald heraus, daß photodynamische Effekte nicht auf eine Schädigung der lebenden Zelle beschränkt sind. Auch nichtzelluläre Substrate wie Enzyme, Toxine und Viren erwiesen sich als empfindlich und ließen sich z.B. durch photo-

dynamisch wirksame Farbstoffe wie Eosin und Methylenblau (4) bzw. durch polyzyklische Aromaten (5) inaktivieren.

Bereits von Margaret R. L e w i s wurde im Jahre 1935 erkannt, daß insbesondere die kanzerogenen polyzyklischen Aromaten photodynamisch wirksam sind. Bei kurzzeitiger Belichtung äußerte sich die Wirkung von 1,2,5,6-Dibenzanthrazen, 1,2-Benzpyren und Methylcholanthren in einer Schädigung des Spindelapparates während der Mitose und der Entstehung abnormaler Zellen (6). D o n i a c h und M o t t r a m berichteten 2 Jahre darauf über eine Sensibilisierung der Mäusehaut durch Benzpyren, Dibenzanthrazen und Teer, wobei die Reaktionen nach Einwirkung von Sonnenlicht in Erythemen und Ödemen der mit den Aromaten gepinselten Hautstellen bestanden (7). Nach einem Vergleich der Karzinogenität mit der relativen photodynamischen Wirkung von 17 polyzyklischen Verbindungen postulieren die gleichen Autoren als Erste einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen beiden Substanzeigenschaften (8,9). In diesem Sinne interpretiert auch C a l c u t t die Ergebnisse einer vergleichenden Untersuchung von 14 chemisch unterschiedlichen Kanzerogenen (10). Schließlich konnten E p s t e i n et al. auf Grund einer umfangreichen Überprüfung von 157 polyzyklischen Verbindungen eindeutig zeigen, daß eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den karzinogenen Potenzen dieser Verbindungen einerseits und ihren photodynamischen Aktivitäten andererseits besteht: stark photodynamisch wirksame Polyzyklen besitzen mit einer 4 mal höheren Wahrscheinlichkeit gleichzeitig auch karzinogene Eigenschaften als solche mit nur schwacher oder fehlender Aktivität (11).

Untersuchungen mit kleinen Säugern deuten ebenfalls

auf einen Zusammenhang photodynamischer und karzinogener Aktivitäten. M a i z i n und D e J o n g h e (12) sowie S a n t a m a r i a et al. (13) beobachteten eine erhöhte Tumorrates bezw. eine erheblich beschleunigte Karzinominduktion bei zusätzlicher Belichtung der mit 3,4-Benzpyren epikutan behandelte Mäusehaut. B ü n g e l e r (14) berichtet über Tumorinduktion in weißen Mäusen durch die photodynamischen Verbindungen Eosin, Hämatoporphyrin und Anthrasol, und G r i f f i n et al. (15) erzeugten Hautkrebs in weißen Mäusen durch i.p. Injektion des photodynamisch aktiven 8-Methoxypsoralens und Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht.

Zur Darstellung photodynamischer Wirkungen wurden in der überwiegenden Mehrzahl der bislang veröffentlichten Arbeiten entweder Protozoen oder andere niedere Tiere herangezogen. Die in vitro-Empfindlichkeit der Zellen höherer Säugetiere, und insbesondere der des Menschen gegenüber photodynamisch aktiven Substanzen ist dagegen noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Untersuchung wurde deshalb dieser Frage unter Verwendung menschlicher embryonaler Lungenzellen und einer Auswahl karzinogener und nicht-karzinogener polyzyklischer Aromaten nachgegangen.

II. Material und Methodik

1. Kultivierung der Zellen

Menschliche embryonale Lungenzellen⁽¹⁾ wurden als

(1) Für die freundliche Überlassung des Zellstammes sind wir Herrn Prof. zur Hausen, Institut für Klinische Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg, zu Dank verpflichtet.

Stammkulturen bei 37°C in Einweg-Gewebekulturflaschen (75 cm² Bodenfläche) in Eagle's MEM-Medium unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum, Glutamin und 100 Einheiten/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die spindelförmigen Zellen bildeten 3 - 4 Tage nach der Beimpfung des Mediums einen am Boden der Kulturflaschen haftenden Zellrasen. Die Stammkulturen wurden an jedem 4. Tag in frisches Medium überimpft. Als Inokulum dienten suspendierte Zellen, die durch Ablösen und Aufbrechen eines Zellrasens mit 0.25 % Trypsin gewonnen wurden.

2. Versuchstechnik

a) Lichtquelle und Bestrahlungsmodus

Als Lichtquelle wurde eine Leuchtstoffröhre vom Typ OSRAM-L, 16 W/25 U "Weiß Universal" verwendet. Der Abstand der Leuchtstoffröhrenwandung zu dem bestrahlten Zellrasen wurde für alle Versuche auf 15 cm fixiert. Die Intensität der langwelligen UV-Strahlung betrug bei diesem Abstand - unter Berücksichtigung eines 10-%igen Verlusts durch Plastik-Kulturflaschenwandung - ca. 300 erg/cm².

Zur Gewährleistung einer konstanten Versuchstemperatur wurde eine kleine Schreibtischlampe mit U-förmiger Leuchtstoffröhre (s. oben) in einen Brutschrank verbracht und die Temperatur so eingeregelt, daß trotz zusätzlicher Wärmeabgabe durch die Lichtquelle 37±1°C gehalten wurde (Abb. 1).

Zur Ermittlung der photodynamisch wirksamen Spektralbereiche wurden folgende Filter eingesetzt:
1) Filter UG1 (Schott, Mainz); Durchlässigkeit für Strahlung 260-430 nm mit maximaler Transmission bei 365 nm und einem 2. Transmissionsbereich von 670 bis über 1000 nm, mit einem Maximum bei 750 nm.

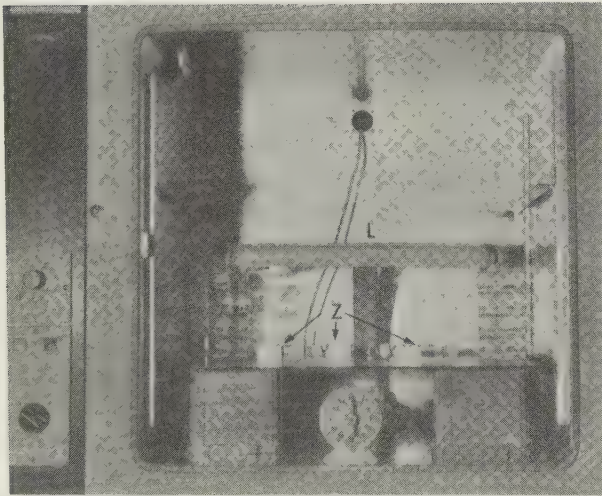


Abb. 1 : Brutschrank mit Schreibtischleuchte (L)
zur Bestrahlung der Zellkulturflaschen (Z).

2) Filter VG4 (Schott, Mainz); Transmission beginnend bei 400 nm, mit Maximum bei 540 nm und fortlaufender Durchlässigkeit bis über 1000 nm hinaus.

3) Filter GG435 (Schott, Mainz); Transmission steil ansteigend von ca. 405 nm mit Maximum bei 515 nm und Strahlungsdurchlässigkeit ab 680 nm. Diese Filtercharakteristika sind in Abb. 2 kurvenmäßig dargestellt.

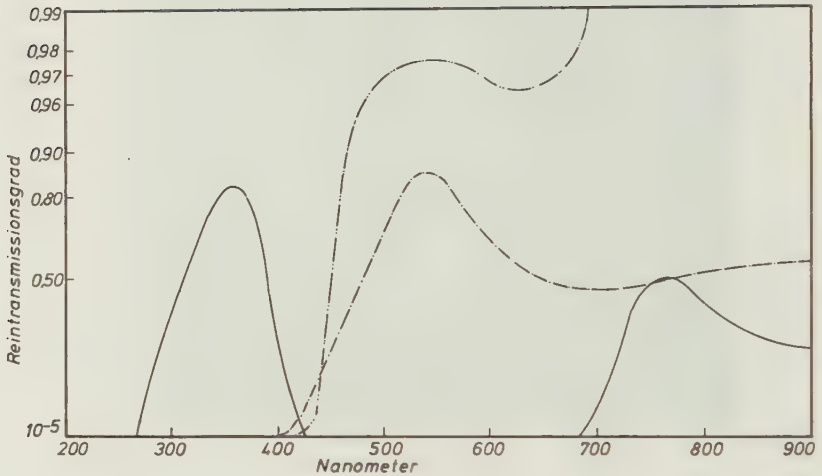


Abb. 2 : Reintransmissionsgrad der verwendeten Schott-Glasfilter (Verhältnis von ein-
dringendem zu ausdringendem Lichtstrom).

———— = Filter UG1
- - - - = Filter GG435
- . - . = Filter VG4

b) Einbringen der polyzyklischen Aromaten in das Kulturmedium

Folgende polyzyklische aromatische Kohlenwasser-
stoffe wurden in ihrer photodynamischen Wirkung
auf die embryonalen Lungenzellen getestet:

1) Benzo(a)pyren (= 3,4-Benzpyren). Diese Substanz ist seit langem durch zahlreiche Untersuchungen im Tierexperiment als hochkarzinogen bekannt. In vergleichenden Wertungsskalen der relativen Karzinogenität wird Benzo(a)pyren ausnahmslos in die höchste Wertungsstufe (z.B. +++ = hochaktiv, in der Skala +++, ++, +, -) eingeordnet. Gleichzeitig gehört es zu den photodynamisch aktivsten polyzyklischen Verbindungen (11).

2) Benz(a)anthrazen (= 1,2-Benzanthrazen). Die Karzinogenität dieser Verbindung ist weniger ausgeprägt als die des Benzo(a)pyrens und wird gewöhnlich mit (++) bewertet. Die aus Versuchen mit Einzellern bekannte photodynamische Aktivität ist hoch, liegt jedoch deutlich unter der des Benzo(a)pyrens (4).

3) Indeno(1,2,3-cd)pyren (= o-Phenylenpyren). Bei mäßiger Karzinogenität (+) besitzt diese Verbindung eine ausgeprägte phototoxische Wirkung für Einzeller (17).

4) Fluoranthen. Nichtkarzinogene, schwach phototoxische Verbindung.

5) Perylen. Nichtkarzinogene Verbindung mit äußerst schwacher phototoxischer Wirkung auf Einzeller (4).

Die Aromaten wurden acetoneisch gelöst in das Zellkulturmedium ohne Serumzusatz eingebracht, sodaß eine Konzentration von 400 ppb erreicht wurde. Die Konzentrationen 200, 100, 50 und 25 ppb wurden durch entsprechende Verdünnung der 400 ppb-Lösung mit Kulturmedium hergestellt. Der Gehalt an Aceton in der Kulturflüssigkeit betrug maximal 0,16 % und zeigte in den Kontrollversuchen keine nachteilige Wirkung auf die Testzellen.

Zu Beginn eines Versuchs wurde das Medium von 3-4 Tage alten Kulturen aus den Flaschen abgegossen

und durch Medium mit zugesetzten Anionen ersetzt. Die Kulturen besaßen zu diesem Zeitpunkt bereits einen ausgebildeten Zellrasen. Durch Umwickeln einer Flaschenhälfte mit Aluminiumfolie diente ein Teil der Kultur durch die weitgehende Eliminierung einfallender Strahlung als Dunkelkontrolle (Abb. 3).

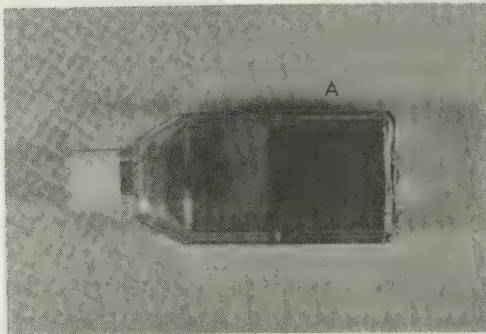


Abb. 3 : Zur Hälfte mit Aluminiumfolie (A) abgedeckte Zellkulturflasche. Die lichtabgeschirmte Seite diente als Dunkelkontrolle.

Nach einer Lichtexposition von 2, 4, 8, 16 bzw. 32 Stunden wurde die Kulturflüssigkeit abgegossen

und die am Flaschenboden haftenden Zellen mit 3 % Formalin fixiert und anschließend mit Löffler's Methyleneblau angefärbt.

c) Auswertung

Mit Hilfe einer Okulurnetzmikrometerplatte wurden auf jeweils 5 Flächeneinheiten einer Flasche die lebenden (spindelförmigen) und toten (abgekugelten und pyknotischen) Zellen ausgezählt und der prozentmäßige Anteil der lebenden Zellen gemittelt.

Jeder Versuch wurde 3-5 mal mit der gleichen Verbindung bei gleicher Konzentration und Bestrahlungsdauer wiederholt. Die Belichtungszeit bis zur letalen Schädigung von 50 % der Kulturzellen wurde graphisch ermittelt.

Als Kontrollen dienten - neben dem lichtabgeschirmten Teil der jeweiligen Kulturflaschen - Kulturen ohne Zusatz von Aromaten, ohne Serum, jedoch mit einem Acetongehalt wie er in den mit Aromaten versetzten Medien vorlag.

III. Ergebnisse

1. Kontrollen

Bis zur maximalen Versuchsdauer von 5 Tagen ließen die Leerkontrollen (+ Licht), Dunkelkontrollen (mit Aromaten, ohne Licht) und Lösungsmittelkontrollen (mit Aceton) keine zytotoxische Veränderungen wie Vakuolisierung, Abrunden der Zellen oder Kernverdichtung und Kernzerfall (Pyknotisierung) erkennen (Abb. 4a,b). Damit konnten die auftretenden Zellschäden bei kombinierter Einwirkung von Aromaten und Licht eindeutig als photodynamische bzw. phototoxische Erscheinung

charakterisiert werden.

2. Schadwirkungen durch photodynamische Aktivitäten der Aromaten

Bei gleicher Konzentration und Belichtungsdauer war das Ausmaß der phototoxischen Zellschädigung durch die 5 verwendeten Aromaten sehr unterschiedlich. Völlig inaktiv zeigte sich Perylen auch bei der höchsten getesteten Konzentration von 400 ppb nach 5-tägiger Lichteinwirkung. Nach Fixation und Anfärbung der Kulturen war nicht nur der folienumwickelte und als Dunkelkontrolle dienende Teil des Flaschenbodens, sondern auch die dem Licht ausgesetzte Hälfte intensiv blau gefärbt. Als gefärbte Strukturen erwiesen sich bei mikroskopischer Betrachtung normal spindelförmige embryonale Lungenzellen.

Hohe phototoxische Aktivität zeichnete dagegen die auch karzinogenen Aromaten Benzo(a)pyren (= 3,4-Benzopyren) und Indeno(1,2,3-cd)pyren aus. Bei Fixation und Anfärbung der 400 ppb-Kulturen nach 2-stündiger Belichtungsdauer fiel die belichtete Hälfte des Zellrasens bereits makroskopisch durch die hellere Färbung auf, und die mikroskopische Auszählung der morphologisch intakten bzw. abgerundet-pyknotischen Zellen wies mit einem Anteil von ca. 25 % runder, geschrumpfter Zellen auf einen rasch einsetzenden, intensiven phototoxischen Effekt. Nach 16 Stunden wurden nur noch 5-10 % spindelförmige, überlebende Zellen gezählt, und nach 32 Stunden markierten nur mehr basophile, karyorrhektische Zellkerne in granuliert - zerfallendem Cytoplasma den Ort des früheren Zellrasens (Abl. 4c,d). Vergleichsweise schwächer photodynamisch wirkte das kanzerogene Benz(a)anthrazen, obgleich auch hier bereits nach 2 Stunden die ersten letal-geschädigten Zellen zu

beobachten waren. Die Absterberate der Kulturen war auch im weiteren Verlauf der Belichtung deutlich geringer, sodaß nach 32 Stunden noch über 10 % der Zellen spindelförmig ausgezogen erschienen und als vital gewertet wurden.

Die äußerst schwache Aktivität des nichtkarzinogenen Fluoranthens drückte sich einmal darin aus, daß bis zur Belichtungsdauer von 8 Stunden keinerlei cytotoxische Veränderungen der Zellkulturen beobachtet werden konnten und erst bei 16 bzw. 32 Stunden ein wachsender Anteil abgerundeter Lungenzellen die immerhin vorhandene Schädigung anzeigte. Die morphologischen Veränderungen der geschädigten Zellen unterschieden sich nicht von denen, die auch bei Einwirkung der kanzerogenen Aromaten beobachtet wurden (Abb. 5).

Die Abhängigkeit der photodynamischen Zellschädigung von der Konzentration der Aromaten im Kulturmedium machte diese Aktivitätsunterschiede weiter deutlich (Tab. 1). Fluoranthen blieb ab 100 ppb und darunter völlig wirkungslos, und selbst bei 200 ppb wurden innerhalb der Beobachtungszeit von 5 Tagen weniger als 50 % der belichteten Zellen abgetötet. Dagegen wurde im Falle des Benz(a)anthrazens noch mit 100 ppb eine LT_{50} von 47 Stunden erreicht während erst ab 50 ppb und darunter ein stärkerer Wirkungsabfall einsetzte.

Die hohe photodynamische Aktivität von Benzo(a)pyren und Indeno(1,2,3-cd)pyren ließ sich auch daran erkennen, daß selbst bei der relativ schwachen Konzentration von 25 ppb die cytotoxische Wirkung unter Belichtung mit einer LT_{50} von 36 bzw. 66 Stunden ausgeprägt war.

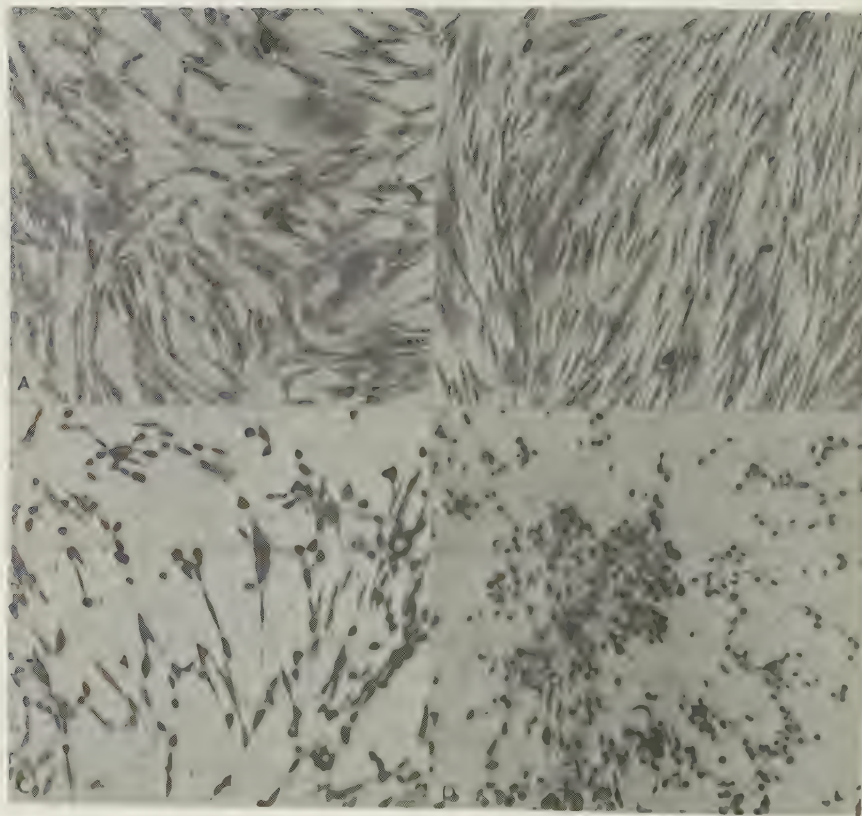


Abb. 4

a) Menschliche embryonale Lungenzellen nach 2-tägigem Kulturwachstum. b) Dunkelkontrolle einer mit 400 ppb Benzo(a)pyren versetzten Lungenzellkultur nach 3-tägiger Einwirkung. c) Absterbende Kultur (400 ppb Benzo(a)pyren) nach 4-stündiger Belichtung. d) Abgerundete, pyknotische Zellen nach 32-stündiger Belichtung (400 ppb Benzo(a)pyren).

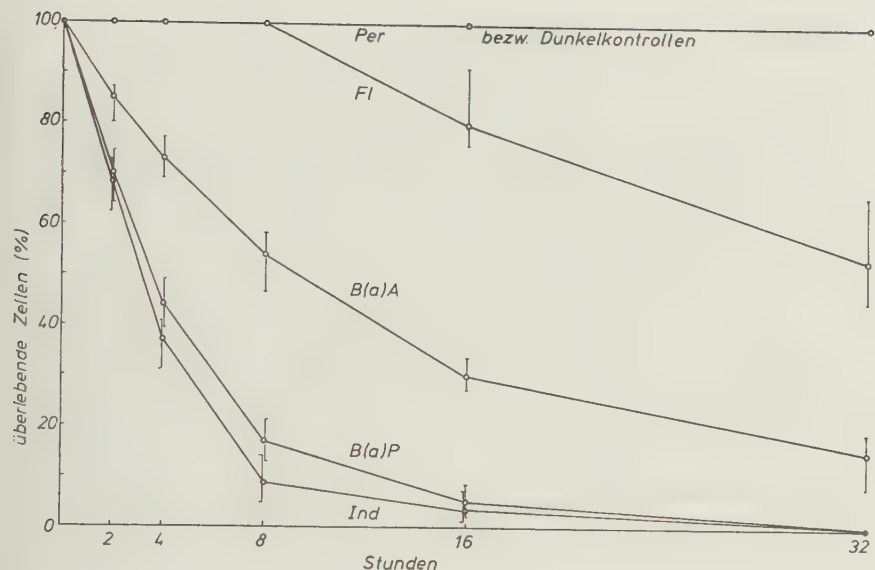


Abb. 5

Zeitlicher Verlauf der phototoxischen Schädigung menschlicher embryonaler Lungenzellen durch die polyzyklischen Aromaten Perylen, Fluoranthen, Benz(a)anthracen, Benzo(a)-pyren und Indeno(1,2,3-cd)pyren bei einer Konzentration von jeweils 400 ppb ($\mu\text{g/l}$). Als Mittelwert von 3 - 5 Versuchen mit der jeweiligen Variationsbreite aufgetragen. Der Aktivitätsunterschied zwischen den hochkarzinogenen Aromaten Benzo(a)pyren bzw. Indeno(1,2,3-cd)pyren ist besonders auffällig. Im Dunklen ("Dunkelkontrollen") wurde über die Versuchsdauer bei den gleichen Konzentrationen der Aromaten keine cytotoxischen Effekte beobachtet, während Perylen auch bei Belichtung der Kulturen inaktiv blieb. Per = Perylen; Fl = Fluoranthen; B(a)A = Benz(a)anthracen; B(a)P = Benzo(a)pyren; Ind = Indeno(1,2,3-cd)pyren.

Tabelle 1

Aromaten	Konzentration(ppb)	Letalzeit ₅₀ (Stunden)
Benzo(a)pyren	25	36
" "	50	16
" "	100	9
" "	200	5,6
" "	400	3,5
Indeno(1,2,3-cd)pyren	25	66
" "	50	23
" "	100	10
" "	200	5,2
" "	400	3,1
Benz(a)anthrazen	50	>125
" "	100	47
" "	200	26
" "	400	9
Fluoranthen	200	>125
" "	400	34,5
Perylen	25	keine Wirkung
" "	50	keine Wirkung
" "	100	keine Wirkung
" "	200	keine Wirkung
" "	400	keine Wirkung

3. Vorinkubation als Wirkungsparameter

Der photodynamische Wirkungsmechanismus hat den Kontakt von photodynamisch aktiver Substanz und Substrat zur Voraussetzung, im vorliegenden Fall mithin die Adsorption an die Zellmembran bzw. das Eindringen in die Zelle. Das Erreichen der maximal möglichen Konzentration am Ort des photodynamischen Geschehens war damit auch ein Faktor der Zeit. Zur Klärung dieses Teilaspekts wurden 400 ppb-Kulturen vor der Belichtung zunächst 2, 4 bzw. 8 Stunden im Dunklen vorinkubiert.

Die Auswertung der Ergebnisse von wiederholten Versuchen ließ eindeutig erkennen, daß bis zur Vorinkubationszeit von 4 Stunden eine Verkürzung der LT_{50} erfolgte (Abb.6). Die Verdoppelung der Vorinkubation auf 8 Stunden brachte dagegen keine zusätzliche Wirkungssteigerung bei anschließender Belichtung.

4. Wirkung von Filtern bestimmter Transmission

Zur Bestimmung der effektiven Spektralbereiche wurden die Zellkulturflaschen mit den betreffenden Filterglasplatten völlig abgedeckt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Wahl der Filter war vor allem durch die Frage bestimmt, ob in erster Linie UV-Licht bis 400 nm oder auch sichtbares Licht mit Wellenlängen über 400 nm für die photodynamische Aktivität der untersuchten Aromaten verantwortlich war. Der zeitliche Verlauf der Zellschädigung durch die Aromaten Benzo(a)pyren, Indeno(1,2,3-cd)pyren, Benz(a)-anthrazen und Fluoranthren ließ klar erkennen, daß die Abtrennung des UV-Bereichs durch die Schott-Filter VG4 und GG435 die photodynamische Wirkung völlig aufhob und damit sichtbares Licht an den photochemischen Reaktionen nicht beteiligt sein kann. Diese Aussage betrifft selbstverständlich nicht die photodynamischen Phänomene im allgemein sondern nur die hier untersuchten

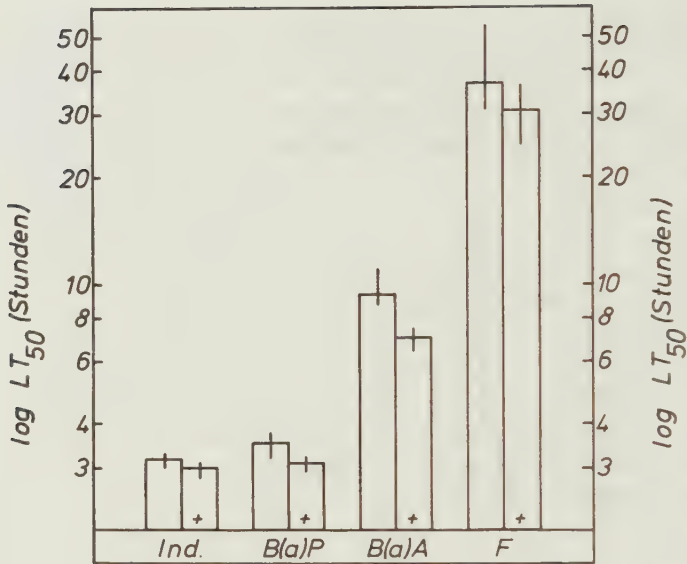


Abb. 6

Einfluß einer 4-stündigen Vorinkubation (+) mit den Aromaten Indeno(1,2,3-cd)pyren (Ind), Benzo(a)-pyren (B(a)P), Benz(a)anthrazen (B(a)A) und Fluoranthen (F), bei einer Konzentration von jeweils 400 ppb (=µg/l), auf die LT₅₀. Im Vergleich zu Kontrollen mit sofortiger Belichtung nach Zugabe der Aromaten () erscheint die Zeit bis zur letalen Schädigung von 50 % der embryonalen Lungenzellen deutlich verkürzt. Perylen blieb auch nach 2-stündiger Vorinkubation inaktiv.

Tabelle 2

Aromaten	Belichtung Stunden	Überlebende Zellen (%); Mittel- werte v. 3-5 Versuchen u. Grenzwerte		
		ohne Filter	Filter UG1	Filter VG4 bezw. GG435
400 ppb				
Benzo(a)- pyren	2	70% (64-75%)	77%	100%
	4	44% (39-50%)	60%	"
	8	17% (13-20%)	28%	"
	16	5% (3-8%)	9%	"
	32	0%	0%	"
Indeno- (1,2,3- cd)pyren	2	68% (62-75%)	74%	100%
	4	37% (31-41%)	49%	"
	8	8% (5-14%)	20%	"
	16	3% (2-7%)	7%	"
	32	0%	0%	"
Benz(a)- anthrazen	2	85% (80-87%)	91%	100%
	4	73% (69-77%)	83%	"
	8	54% (46-58%)	67%	"
	16	30% (27-34%)	43%	"
	32	15% (8-19%)	26%	"
Fluor- anthen	2	100%	100%	100%
	4	100%	100%	"
	8	100%	100%	"
	16	80% (76-91%)	88%	"
	32	53% (45-61%)	70%	"
Perylen	2	100%	100%	100%
	4	"	"	"
	8	"	"	"
	16	"	"	"
	32	"	"	"

Aromaten mit den für sie spezifischen Absorptionsmaxima. Bei Verwendung des Filters UG1 mit seinem Transmissionsmaximum im langwelligen UV wurde die Zellschädigungsrate zwar verlangsamt, doch gleicht der Verlauf der Wirkung weitgehend dem der Kontrollen ohne Filter, mit weitgehender Abtötung der Kulturen nach 16-stündiger Belichtung. Der wesentliche Anteil wirksamer Strahlung dürfte nach diesen Befunden im UV von 300 - 400 nm zu suchen sein, wobei die beobachtete Verzögerung der photodynamischen Aktivität im Falle des Filters UG1 in erster Linie durch Reduktion des einfallenden Lichtstroms im langwelligen UV-Bereich bei 365 nm um ca. 20 % (Reintransmissionsgrad des Filters etwa 0.60) zu erklären ist.

IV. Diskussion

Lichtdermatosen als Folge photodynamischer Phänomene sind seit langem bekannt. Die aktiven Substanzen finden sich als Furocumarine in Pflanzen ("Wiesengräserdermatitis"), in Tonika und Likören ("Berlock-Dermatitis"), in Arzneimitteln (Tetracyclinen, Phenothiazinen, Griseofulvin u.a.m.), als Farbstoffe in Kosmetika und Therapeutika (Eosin, Akridin, Trypaflavin) und in Teerbestandteilen, die bei beruflicher Exposition Lichtdermatosen erzeugen (19). Schon Raab (1) berichtet über die "rosige Hautröthe - Buchweizenkrankheit" (Geeldikkop), die seit 1873 bekannt ist und als Rötung und Schwellung des Kopfes von Schafen nach Aufnahme von Wiesenspflanzen der Genera Tribulus und Hypericum bei Sonneneinstrahlung in Erscheinung tritt.

Andererseits wurde die mögliche Rolle photodynamischer

Reaktionen bei der Krebsinduktion bislang wenig untersucht, obwohl die gegenwärtig stark zunehmende Hautkrebsrate von Klinikern mit der modischen, exzessiven Sonnenexposition in Zusammenhang gesehen wird und Plattenepithelkarzinome und -präkanzerosen bevorzugt die dem Licht ausgesetzte Körperstellen wie Ohren und Gesicht sowie bei Rauchern vor allem die Unterlippe befallen (17).

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war deshalb neben der Feststellung der prinzipiellen Empfindlichkeit menschlicher Zellen in vitro gegenüber photodynamischen Verbindungen vor allem die Klärung der Frage, ob die bei Einzellern beobachteten Schadwirkungsunterschiede - entsprechend der Karzinogenität der einwirkenden Verbindungen - auch für menschliche Zellen Gültigkeit besitzen. Tatsächlich konnte bei Einwirkung von 5 polyzyklischen Aromaten der eindeutige Nachweis erbracht werden, daß menschliche embryonale Lungenzellen ebenfalls in erster Linie durch die karzinogenen Vertreter phototoxisch geschädigt werden, während die Nichtkarzinogenen ohne Wirkung blieben bzw. eine nur schwache Aktivität nach protrahierter Einwirkungszeit erkennen ließen. Menschliche und tierische Zellen scheinen demnach auf photodynamische Verbindungen ähnlich empfindlich zu reagieren, eine Feststellung, die allen früher (24) an niederen Organismen erhobenen Befunden erhöhtes Gewicht verleiht, da insbesondere die Ergebnisse der umfangreichen Untersuchungen zur Frage der Korrelation kanzerogener und photodynamischer Aktivitäten nunmehr z.T. auf die menschliche Zelle übertragbar erscheinen. Zur Bewertung gesundheitlicher Risiken durch die in Rußen und Stäuben in Vielzahl enthaltenen kanzerogenen

Aromaten kommt den an menschlichen Zellen nachweisbaren relativen Aktivitäten einzelner Aromaten, aber auch im integrierenden Zusammenwirken des Gesamtspektrums dieser Verbindung in Rohextrakten, eine wichtige Indikatorfunktion zu, die bei geringem technischen und vor allem auch zeitlichem Aufwand eine rasche orientierende Beurteilung lokaler Situationen in Hinblick auf inherente Krebsrisiken ermöglicht. Darüberhinaus bietet sich durch die hier entwickelte Versuchstechnik an, photodynamische Phänomene nunmehr an der menschlichen Zelle statt wie bisher an niederen Tieren zu studieren und ihre mögliche Relevanz bei neoplastischen Zellumwandlungen kritisch zu überprüfen.

Unter den bisher bekannten photodynamischen Wirkungsparametern sind neben der Wirkungssteigerung durch Vorinkubation mit den aktiven Verbindungen im Dunkeln, die zuerst bei Versuchen mit Ciliaten (23) beobachtet wurde und in den vorliegenden Untersuchungen ihre Parallele findet, die Schutzfunktion von Antioxidantien und bestimmter Plasmaproteine zu erwähnen (20) sowie Verstärkung des phototoxischen Effekts durch Tenside (17) und die mono- und divalenten Anionen von Natrium- und Kaliumsalzen (20).

Die Frage nach den photodynamisch aktivierenden Spektralbereichen wurde in früheren Arbeiten meist nicht eindeutig beantwortet. Häufig verwendet wurden Hochdruck-Quecksilberdampf Lampen in Verbindung mit Filtern, die entweder nur für den UV-Bereich unter 330 nm undurchlässig waren (9,10) oder eine Transmission von 300 - 400 nm mit einem Maximum bei 365 nm besaßen (11, 21, 5, 22). Dabei blieb die mögliche Wirkung sichtbaren Lichts unbekannt. Obwohl die photodynamische Wirkung - wie alle photochemischen

Reaktionen - die Lichtabsorption durch die aktiven Verbindungen zur Voraussetzung hat und die Absorption dieser Verbindungen in reinen Lösungen bekannt ist, muß immerhin mit einer Verschiebung der Absorptionscharakteristika während des noch ungenügend bekannten photodynamischen Reaktionsgeschehens gerechnet werden. In Versuchen mit Ciliaten konnten allerdings Mottram und Doniach (8) bereits feststellen, daß durch das Herausfiltrieren der Wellenlängen unter 410 nm die photodynamische Wirkung sowohl einer Reihe kanzerogener polyzyklischer Aromaten, aber auch von Teer und Ruß, aufgehoben wurde. Da im Teer und Ruß tatsächlich eine Vielzahl photodynamisch aktiver aromatischer Verbindungen vom Typ des 3,4-Benzpyrens enthalten ist, war danach zu vermuten, daß für die Mehrzahl der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe das sichtbare Licht keine photoreaktive Wirkung besitzt. Die hier durchgeführten Versuche an menschlichen Zellen mit selektiv durchlässigen Filtern haben eindeutig gezeigt, daß Wellenlängen über 400 nm völlig wirkungslos bleiben, während andererseits bei Bestrahlung mit langwelligem UV mit einem Transmissionsmaximum von 366 nm praktisch die volle Aktivität der Aromaten zur Wirkung kam.

Literatur

- 1) Raab, O.: Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Z. Biol. 39, 524 (1900)
- 2) Tappeiner, H.v.: Untersuchungen über den Angriffsort der fluoreszierenden Substanzen auf rote Blutkörperchen. Biochem. Z. 13, 1 (1908)
- 3) Metzner, P.: Zur Kenntnis der photodynamischen Erscheinung. III. Mitteilung über die Bindung der wirksamen Farbstoffe in der Zelle. Biochem. Z. 148, 498 (1924)
- 4) Tappeiner, H.v., und A. Jodlbauer: Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. Leipzig 1907
- 5) Graffi, A., H. Kriegel, A.J. Schneider, G. Sydow, V. Beyer, I. Guse und L. Kügler: Versuche über die photodynamische Wirkung des Benzpyrens auf einige Mitochondrienfermente der Rattenleber. Arch. Geschwulstforsch. 6, 226 (1953)
- 6) Lewis, M.R.: The photosensitivity of chick embryo cells growing in media containing certain carcinogenic substances. Am. J. Cancer 25, 305 (1935)
- 7) Doniach, I., und J.C. Mottram: Sensitization of the skin of mice to light by carcinogenic agents. Nature 140, 588 (1937)
- 8) Mottram, J.C., und I. Doniach: The photodynamic action of carcinogenic agents. The Lancet 234, 1156 (1938)
- 9) Doniach I.: A comparison of the photodynamic activity of some carcinogenic with non-carcinogenic compounds. Brit. J. Exp. Path. 20, 227 (1939)
- 10) Calcutt, G.: The photosensitizing action of chemical carcinogens. Brit. J. Cancer 8, 177 (1954)
- 11) Epstein, S.S., M. Small, H.L. Falk und N. Mantel: On the association between photodynamic and

- carcinogenic activities in polycyclic compounds.
Cancer Res. 24, 855 (1964)
- 12) Maizin, J., und A. De Jonghe: Au sujet de l'action de la lumière et de l'ozone sur certains corps cancérogènes. Comptes Rend. de Séances de la Société de Biologie 117, 111 (1934)
 - 13) Santamaria, L., G.G. Giordano, M. Alfisi und F. Cascione: Effects of light on 3,4-benzpyrene carcinogenesis. Nature 210, 824 (1966)
 - 14) Büngeler, W.: Z. Krebsforsch. 46, 130 (1937)
 - 15) Griffin, A.C., R.E. Hakim und J. Knox: The wave length effect upon erythematous and carcinogenic response in psoralen treated mice. J. Invest. Dermat. 31, 289 (1958)
 - 16) Bauer, L., und W. Gräf: Über das Zusammenwirken von polyzyklischen Aromaten und Licht unter dem Gesichtspunkt der Synkanzerogenese. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 161, 304 (1976)
 - 17) Bauer, L.: Über die Steigerung phototoxischer Wirkungen polyzyklischer Aromaten durch Haushaltsspülmittel (Tenside). Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 164, 455 (1977)
 - 18) Steigleder, G.K.: Dermatologie und Venerologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 1975
 - 19) Tronnier, H.: Lichtschutz der Haut und Lichtdermatosen. Deutsches Ärzteblatt 45, 3101 (1973)
 - 20) Epstein, S.S., und W. Burroughs: Some factors influencing the photodynamic response of Paramecium caudatum to 3,4-benzpyrene. Nature 193, 337 (1962)
 - 21) Stephano, C.S.: A tentative microbiological assay for carcinogenicity below the microgram level. Microchem. J., Symposium Ser.1, 115 (1961)
 - 22) Reske, G., und J. Stauff: Modellversuche zur chem-

ischen Karzinogenese und zum photodynamischen Effekt von 3,4-Benzpyren und UV-Licht in wäßrigen Proteinlösungen mit verschiedener SH-Gruppenaktivität. Z. Naturforsch. 19 b, 716 (1964)

- 23) Epstein, S.S., M. Burroughs und M. Small: The photodynamic effect of the carcinogen, 3,4-benzpyrene, on Paramecium caudatum. Cancer Res. 23, 35 (1963)
- 24) Gräf, W., und A.G. Haller: Die Phototoxizität kanzerogener polyzyklischer Aromaten und ihrer Umwandlungsprodukte im biologischen Modellversuch. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 164, 250 (1977)

Für seine große Hilfsbereitschaft, Anregungen und Diskussionsbereitschaft möchte ich Herrn Dr. L. Bauer, Institut für Umwelthygiene und Präventivmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, besonders herzlich danken. Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Dr. W. Gräf, Vorstand des Instituts für Umwelthygiene und Präventivmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, für die freundliche Übernahme des Referates.

Lebenslauf

Am 8. Januar 1949 wurde ich, Linda Gretel Mueller, als Tochter des ausgewanderten deutschen Diplomingenieurs Bernhard Mueller und seiner Frau, die Hausfrau Ilse Mueller (geb. Höhn), in Yonkers, New York / U.S.A. geboren.

Ausbildungsgang in Stichworten:

- | | |
|------------|---|
| 1954-1961 | Elementary School (Grundschule) in Yonkers und in Mount Vernon, New York / U.S.A. |
| 1961-1964 | Junior High School (Mittelschule) in Mount Vernon, New York |
| 1964-1967 | High School (Gymnasium) an der Mount Vernon High School, Mount Vernon, New York |
| Sept. 1967 | Beginn des Psychologiestudiums an The University of Rochester, Rochester, New York |
| Juni 1971 | Abschluss des Psychologiestudiums mit dem Grad Bachelor of Arts Degree with Distinction in Psychology von The University of Rochester |
| Okt. 1971 | Beginn eines einjährigen Weiterstudiums der klinischen Psychologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, ermöglicht durch ein Kilian-Schmitt-Austauschstipendiums der Universität Rochester |
| Okt. 1972 | Beginn des Medizinstudiums an der Universität Erlangen-Nürnberg |
| 27.8.1974 | Ärztliche Vorprüfung |
| 29.8.1975 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 26.8.1977 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 16.10.1978 | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |

Erlangen, den 19.3.1979

Linda Gretel Mueller

